

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-219965

(43)公開日 平成6年(1994)8月9日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 39/395	N 9284-4C			
G 01 N 33/15	Z 7906-2J			
33/53	V 8310-2J			
33/574	Z 9015-2J			
33/58	7055-2J			

審査請求 有 発明の数1 FD (全12頁)

(21)出願番号	特願平5-291327
(62)分割の表示	特願昭59-501642の分割
(22)出願日	昭和59年(1984)4月4日
(31)優先権主張番号	4 8 1 9 3 4
(32)優先日	1983年4月4日
(33)優先権主張国	米国 (U.S.)

(71)出願人	593102264 アメリカ合衆国 THE UNITED STATES OF AMERICA アメリカ合衆国バージニア州、スプリング フィールド、ポート、ロイヤル、ロード、 5285 ナショナル、テクニカル、インフォ ーメーション、サービス気付 (72)発明者
	ランス・エー・リオッタ アメリカ合衆国 メリーランド州 20817、 ベセスダ、ソノマ・ロード 5621
(74)代理人	弁理士 鈴江 武彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 薬剤の有効性の評価方法

(57)【要約】

【目的】薬剤の有効性を評価するための方法を提供する。

【構成】化学療法剤と、ラミニンに対する細胞受容体であって、ガン細胞の表面で発現しているものに対するリガンドとの結合体を、ある群のガン細胞と相互作用させる。これにより、この結合体をガン細胞に直接取り込ませて、生体内または生体外において、その化学療法剤のガン細胞に対する効果を評価する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化学療法剤とラミニンに対する細胞受容体であってガン細胞表面で発現しているものに対するリガンドとの結合体を有する群のガン細胞と相互作用させることを含む、その薬剤の有効性を評価する方法。

【発明の詳細な説明】

背景の技術

基底膜は、器官の実質細胞とコラーゲン様間質とを仕切る細胞外マトリクスの特殊な形態であり、生体内に広汎に分布している。細胞とこのマトリクスとの相互作用は、正常細胞および新生細胞の作用として重要である。正常細胞は生存、増殖および分化に関し細胞外マトリクスを必要とすると思われるが、一方、移動性の細胞は正常細胞であろうと新生細胞であろうと、ある組織から別の組織へ移動する際に必ず基底膜を通過する。特に、鱗状上皮または腺上皮から発生した転移性ガン細胞は循環系やリンパ系に入るとき、基底膜を必ず通過する（血管内異物侵入）。体内を循環している新生細胞は、一般に器官の毛細血管床に捕捉され、血管壁に侵入しそして基底膜を通過して、血管外組織へと移動する（溢出）。そこで第2の腫瘍が確立される。細胞の基底膜との相互作用はこのような理由により大きな興味の的となっている。

【0001】細胞と細胞外マトリクスとの相互作用は細胞が自身をマトリクスに付着させる能力に応じて異なる。この付着現象は特異的な糖タンパクにより仲介されて起こることが知られている。その糖タンパクは細胞を、マトリクスに存在する様々な型のコラーゲンに結びつける。例として、フィプロネクチンを仲介とした、線維芽細胞、筋原細胞および平滑筋細胞の間質性I型、I II型コラーゲンへの付着、さらにコンドロネクチンを仲介とした、軟骨細胞の軟骨組織II型コラーゲンへの付着がある。

【0002】正常細胞と新生細胞は同様な仲介を受けて基底膜へ付着することがわかっている。基底膜の基本的な構成成分はIV型コラーゲン、糖タンパクおよびプロテオグリカンである。糖タンパクでありラミニンは、上皮細胞と新生細胞の基底膜への付着の仲介役をなし、これらの細胞をIV型コラーゲンへ結合させる。以後にその機構を記載する。上記のことく、転移性腫瘍細胞が転移過程の分裂段階で基底膜を必ず通過するという理由および転移過程の第一段階は腫瘍細胞の基底膜への付着であるという理由から、この機構を解説し、腫瘍細胞のこの膜への付着を促進または阻害する特異的付着因子の特性を記述することは、ガンの診断および治療において重大な意味を有するものである。

【0003】発明の開示

ラミニンに対して特有な細胞マトリクス受容体を完全に単離し精製することおよびラミニン分子の基質特異的結合領域の特性を決定することにより、本発明によるガン

の診断および治療の方法が可能になった。プロテアーゼにより誘導されたラミニンフラグメント上の基質に基づいてこれらの領域を単離することによって、特異的結合能をもったフラグメントを選択することが可能となる。というのはそれぞれのフラグメントが完全な分子に存在するこれらの領域の少なくともひとつ（すべてではない）を含むからである。特に興味の的となるのは、細胞マトリクス受容体に対する結合部位をただひとつ有するフラグメントである。この受容体はラミニン分子上の受容体結合領域に対して高い親和性をもつが、ヒトのガン細胞及びおそらく上皮細胞に特徴的なものである。この受容体はこれらの細胞表面上に存在していて、原形質膜の抽出物から単離することができる。

【0004】本発明の範囲内のこの模式に基づいた生物検定には免疫検定、特に予後に用いられる放射免疫検定が含まれる。そしてこれらは臨床標本に適用されるが、転移性細胞によって発現されたラミニン細胞受容体の検出と定量のため、あるいは混じり合った細胞群から高い転移性をもった腫瘍細胞を分離するために、行なわれる。治療手段としては、ラミニン分子に作用的あるいは拮抗的なラミニンフラグメントを用いて宿主を処理することが考えられ、その結果ラミニンフラグメントは腫瘍細胞のIV型コラーゲンへの付着を阻害し、転移のために造血因子が増えることを抑える。適当なラミニンフラグメントは、既知のあるいは実験的化学療法剤に対するリガンドとしても使用されることがある。すなわちこれらのフラグメントと毒素を結合することにより、その結合体を転移性の腫瘍細胞に直接取り込ませることができ、ガンの生体内での治療が可能になり、あるいは生体内または生体外での薬剤の評価が可能になる。今述べたモデルは、ガンの化学療法に使用のための合成結合部位をもつ類似化合物を評価する上にも役立つものである。他に提案されている治療的用途として、細胞のIV型コラーゲンへの接着を促すため、例えば火傷治療において上皮細胞の接着および増殖を促すためにラミニンあるいは適当なラミニン断片を使用することが挙げられる。これらの断片およびラミニン自体は受容体細胞に対して増殖因子として広く作用し得る。そして細胞の付着及び分散を促進したり、細胞分裂を促進したりする。

【0005】発明を実施するための最良の形態

糖タンパクであるラミニンは基底膜に特異的に局在しており、膜の糖タンパク構成成分の主要なものである。ラミニン受容体を有する細胞は、基底膜のラミニン成分へ直接結合することができるが、侵入細胞にとって好ましい経路には、ラミニン仲介による基底膜のIV型コラーゲン成分への付着がある。転移性の細胞からラミニンが分泌されることにより、侵入が容易になる。

【0006】ラミニン（分子量10⁶）を還元してポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、見かけの分子量200,000（ α 3サブユニット）と400,00

0 (β サブユニット) をもった2つのサブユニットに分かれる。電子顕微鏡技術によれば、ラミニンの立体構造は1本の長い腕 (77 nm) と3本の同じ長さの短かい腕 (37 nm) とを有するラテン十字架と同じであることが示された。十字架の3本の短かい腕は α 3サブユニットを含み、3本の同一 (分子量200,000) の鎖より成っているが、一方、十字架の長い腕は β サブユニット (分子量400,000) を含んでいる。すべての腕は末端に球状の単位を有している。

【0007】ラミニンは細胞マトリクス受容体 ($k_d = 2$ nm) およびIV型コラーゲンさらにヘパリンに対しても高い親和性をもつ。本発明によれば、分子の異なる部位に存在する基質特異的結合領域は、ラミニンの酵素消化産物を使った細胞付着およびコラーゲン結合分析法によってその特性が決められた。 α トロンビン、ペプシンおよびカテプシンGを用いて分子を消化すると、完全なラミニンが示す結合能よりも限られた結合能しかもたな*

ラミニンおよびラミニンフラグメントの、IV型コラ

ゲンへの結合率およびヒト乳ガン腫細胞をIVコラ

ゲンへ付着せしめる率

ラミニンまたは フラグメント	結合 %	付着%	
		MCF-7	T47-D
ラミニン	80	84	28
α 3	85	81	29
P 1	15	13	11
C 1	10	11	10
無添加	-	48	22

(注) ラミニンおよびラミニン断片のIV型プロコラーゲン (ニトロセルロースに固定化されている) への結合を測定したが、これに用いたラミニンは完全分子のものとプロテアーゼにより消化され精製したものである。リガンド10マイクログラムをIV型コラーゲンに添加した。MCF-7およびT47-D細胞のIV型コラーゲン基質への付着パーセントを示したが、これは様々なラミニンフラグメント存在下で得られた。トリプシン処理したての細胞を、血清を含まないダルベッコー型のイーグル培地 (分子量600,000のラミニン1 μ g/m1、 α 3ラミニンフラグメント1 μ g/m1、P 1ラミニンフラグメント100 μ g/m1またはC 1ラミニンフラグメント100 μ g/m1添加) で3時間培養した。未付着細胞を除去し、計数した。付着細胞は培養ざらをP₁/NaClで洗い、0.01%トリプシン/0.1%E

*いフラグメントを生じる。完全なラミニンおよびこれらのフラグメントの構造上の特性を図1に示す。ラミニンを α -トロンビンで消化することにより生じる α 3フラグメントは長鎖 (分子量400,000) フラグメントを欠くが、末端の球状領域を備えた短鎖を有している。ラミニンをペプシンまたはカテプシンGで酵素消化すると、それぞれP 1 (分子量280,000) およびC 1 (分子量350,000) フラグメントを生じる。これによってその分子の長鎖は欠落し、短鎖末端の球状領域も変化をうける。完全なラミニンと α 3、C 1およびP 1フラグメントの機能的特徴を図1および表1に総括する。同じような分子量と結合能を有するC 1およびP 1フラグメントは、ラミニンをプラスミンまたはキモトリプシンで消化することによっても得られる。

【0008】

【表1】

DTA溶液で処理し培養ざらから剥して電気的に計数した。データは4回の平均をとったが、どの値も平均値の10%以内の範囲に入っていた。感受性は100 μ g/m1程度の低さであった。

【0009】ラミニンを α トリプシンで消化しても、それによって得られる α 3フラグメントの細胞受容体あるいはIV型コラーゲンへの結合能は何ら変化しない。P 1またはC 1フラグメントは、樹立ヒト乳ガン腫細胞をIV型コラーゲンへ仲介する能力を持たないが一方 α 3フラグメントは完全ラミニン分子に匹敵する仲介能を有している。すなわち、どちらも付着を促進する。図2に見られるように、P 1フラグメントはヒト乳ガン腫細胞のIV型コラーゲンへの付着を抑制する。同様にC 1フラグメントもガン細胞のIV型コラーゲンへの付着を抑制する。さらに同じような実験観察記録 (データは示さないが)

では、P1, C1フラグメントは1 μg/mlの濃度で使用するときMCF-7のIV型コラーゲンへの付着を完全に抑制する。比較のために、ラミニンが仲介するヒトガン細胞の付着に関する投与量-反応曲線を図3に示す。フィブロネクチンは細胞のI型コラーゲンへの付着を仲介するが、同じ投与量範囲でラミニンは細胞のI型*を仲介するが、同じ投与量範囲でラミニンは細胞のI型*

ヒト乳ガン腫細胞の付着

細胞	付着%	
	I型	IV型
MCF-7	22	68
ZR-75-1	54	44
T47-D	62	33

(注) I型およびIV型コラーゲンを塗布した培養ざらに対して細胞の付着率を、血清を含まないダルベッコ型イーグル培地中で3時間培養後に測定した。付着のための定量法は図3の説明において詳述する。データは5%以上異なる4つの値の平均である。

【0011】ラミニン分子上に存在する結合領域はデータに基づいて特徴づけし、図1に示したように図化した。細胞マトリクス受容体は、プロテアーゼ耐性で、ジスルフィド結合により結合された、ラミニン分子の3つの短かい腕の交差部分に結合する。IV型コラーゲンへの結合領域は短かい腕の球状部分がその近くに存在する。一方ラミニン分子の長腕はヘパリン硫酸プロテオグリカンに結合する。α3フラグメントは細胞結合領域とコラーゲン結合領域の両方を備えているので、このフラグメントは完全ラミニン分子の仲介能と等しい仲介能を有する。ペプシンまたはカテプシンGで短腕の球状部分を除去すると、IV型コラーゲンに対する結合領域が消えることになる。従って、そうしてできたフラグメントは基底膜への細胞の付着を仲介することができない。しかしながらP1およびC1フラグメントは細胞受容体への結合領域を維持しており、受容体を占有することができ、ラミニンの完全分子と拮抗し合う。

【0012】細胞マトリクス受容体の単離と精製は原形質膜からの表面活性剤による抽出およびラミニンアフィニティークロマトグラフィーを使って行なわれた。精製した受容体の分子量は約50,000から約75,000 (SDSポリアクリルアミド電気泳動) である。そしてその受容体はラミニンに対して大きな結合親和性 ($k_d = 2 \text{ nm}$) を有するが、この親和性は原形質膜や完全細胞のそれに近い。その受容体はヒトの腫瘍細胞とネズミの腫瘍細胞において同定された。

【0013】ヒトガン細胞特にガン腫細胞の受容体を持った細胞を診断するための方法の開発が進められている

*コラーゲンへの付着を促進しなかった(データは示さない)。特異的付着因子の非存在下、樹立細胞のI型、IV型コラーゲンへの正常結合能を表2に総括する。

【0010】

【表2】

が、それは組織や細胞の診断学的生検のような臨床標本に基づいたガンの診断や予後に有力なものとして企図されたものである。

【0014】一般に、免疫検定法型の結合分析法がよく知られており有効である。例としては放射免疫検定法あるいは酵素免疫検定法がある。それらには、標識リガンドであるラミニンとして生物学的に活性な細胞受容体部位をもった適当なラミニンフラグメントが用いられるか又は純粋な細胞受容体に対する、ウサギやヤギといった異種の動物から得られた抗体、若しくは望ましい親和性や特異性をもったモノクロナール抗体が使用される。代表的な分析法として、細胞受容体の原形質膜抽出物の上で拮抗的に結合を起こさせる分析法が従来からある。これには固定化されたリガンドや受容体が使われる。これらの結合法を実施するための診断用キットは本発明に属す。これらは、例えば遊離又は固定化放射標識ラミニン又はラミニンフラグメントを含み、もし抗体を用いるならばサンドイッチ型のキットも含む。そのサンドイッチ型キットには例えば標識抗体および抗-抗体が含まれている。結果は、標本の特異的結合をスキャッチャード分析 (Scatchard, Ann. N. Y. Acad. Sci. 51 : 660-672, 1949) により評価し、関連する型を培養ガン腫細胞の結合親和性と比較するのに適している。ヒト乳ガン腫細胞のスキャッチャード結合分析法によれば推定 k_d 値は転移性ガン腫 (MCF-7) 細胞に対して、502.2 nmとなり、細胞あたりの受容体は計算上すべての型のガン腫に対して約10,000から100,000となる。これに対して、新生細胞を含まない哺乳類の線維芽組織の場合、スキャッチャード分析によれば結合の特異性はみられなかった。

【0015】細胞受容体結合部位を有し、コラーゲン結合領域を欠いたラミニンフラグメント (P1およびC1) は診断用の結合検定法に有用であるとともに、転移

を抑制してガン治療上有効であると期待が集まっている。試験管内でのマウスの試験において、各フラグメントは外来のラミニン存在下 B L 6 マウス黒色腫細胞のIV型コラーゲンへの付着を抑制した。C 1 フラグメントは、B L 6 黒色腫細胞と前培養するとき、生体内で投与量に依存して造血組織への転移を顕著に抑制し、阻害する。さらにフラグメントには実験動物において毒性がなく、免疫上の副作用も見られない。また、これらのフラグメントは効果的な化学療法剤を標的薬剤とする場合に有用であり、既知の効果的な抗腫瘍剤の担体としても有用である。薬剤をリガンドと結合させることにより、毒性のある薬剤を侵入性の腫瘍細胞の表面に局在させることができる。例えばリシンのような薬剤を既知の方法によってリガンドに結合させることができ、このような方法はそのような薬剤を腫瘍関連抗原に対する抗体を結合するのに使われる。

【0016】本発明の概念は、細胞分化、有糸分裂生殖形態形成および腫瘍形成を含む多様な生物的過程に対する示唆を含んでいる。ここで述べる方法は次のような仮説に基づいているところもある。すなわちすべての良性腫瘍や潜在ガンにおいて、基底膜は連続的な構造を保ち、良性細胞の場合、ラミニン受容体は基底膜へ付着することによって占められるという仮説である。ガンが侵入性であることは、侵入性の腫瘍細胞のまわりに基底膜が形成されないことによって証明される。このような侵入性の腫瘍細胞は細胞表面に発現された多数のラミニン受容体を含むことがあるが、上皮細胞や良性腫瘍とは対照的にリガンドに結合しない。転移性ガン腫細胞上のラミニン受容体部位の独自の有効性が解明されれば、ガンの治療および診断に関する重要な概念が明らかになろう。

【0017】

【実施例】例示した概念は次の出版物に詳しく述べられている。これらはこの明細書に組み入れられたものとする。Terranova ら、Proc. Natl. Acad. Sci., 80: 444-448 (1983) および Rao ら、J. Biol. Chem., 257: 9740-9744 (8月, 1982)。

実施例 I. ラミニンフラグメントの調製

A. 材料と方法

1. 精製した α トロンビンはJohn W. Fenton (N. Y. Dept. of Health, Albany) から譲り受けた。 α トロンビンによる消化はpH 7. 6, 25°Cで、酵素対基質の重量比1:100として行なった (Thromb. Res., 21: 663-673に記載のごとく)。トロンビンの消化はヒルジン(シグマ社)を二倍量添加することにより阻害された。ペプシン、 α トロンビンおよびカテプシンGによるラミニンの消化は次の文献どおりに行った。Cancer Res., 41: 4624-46; Hoppe-Seyley's Z. Physiol. Chem., 361: 1651-1660 (1980); J. Mol. Biol., 257: 9740-9744 (1982)、および Arch. Biochem. Biophys., 219: 65-70 (1982)。

10

20

30

40

50

hys., 219: 65-70 (1982)。キモトリプシンおよびプラスミンによるラミニンの消化は同じくこれらの出版物の中に記載されており、これらはこの明細書に組み入れられたものとする。

【0018】2. プロテアーゼフラグメントは、上記の Terranova らおよび Rao らの文献どおりに HPLC (ベックマン) を使って単離し、SDS を含んだ 5% ポリアクリルアミドスラブゲルを使った電気泳動により検討した。プラスミンまたはペプシンによるラミニンの消化によって得られた P 1 フラグメントの特徴およびキモトリプシンまたはカテプシン G によるラミニンの消化によって得られた C 1 フラグメントの特徴は上記の文献に記載されている。 α 3 フラグメントの特徴も同様に記載されている。

実施例 II 結合分析法

A. 材料と方法

1. 樹立細胞系

MCF-7 樹立ヒト乳ガン細胞はミシガン財団から供与を受けた。ヒトおよび哺乳類起源のこの細胞の特徴はすでに要約した。この細胞はヌードマウスに対して侵入性と転移性を示した。ヒト羊膜結合組織を障壁として使用した場合、この細胞は試験管内でも侵入性を示した。

【0019】ZR-75-1 および T 47-D 樹立ヒト乳ガン細胞は L. Engel (国立ガン研究所、病理学研究室) から送られた。これらの細胞は、電子顕微鏡によりガン腫細胞の特徴をもつこと、また核型分析によりヒト由来であること、さらに乳腺特有の分泌性の乳タンパクを含んでいることが確認された。これらの樹立細胞のどちらもヌードマウスにおいて増殖が遅く、大きな転移は見られなかった。たとえ、生後間もないヌードマウスに異種間の皮下移植が行なわれたときでさえそうであった。正常ヒト皮膚線維芽細胞 (CRL 1507 および CRL 1477) は米国タイプカルチャコレクション (the American Type Culture Collection) から供与をうけた。

【0020】2. 基質、付着因子およびラミニンフラグメントの調製

ラミニンフラグメントは実施例 I で記載したように調製した。I 型コラーゲンはエジプト豆中毒症のラットの皮膚から調製した (Biochemistry, 5: 3460-3473 (1966))。IV型コラーゲンはエンジェルブレス・ホルム・スワン腫から調製した (FEBS Lett. 127: 257-262, (1981) および J. Biol. Chem., 254: 9933-9937, (1979))。ラミニンはラクトバーオキシダーゼ法によりヨウ素化した (Biochem. Biophys. Acta, 251: 363-369, 1969)。

【0021】3. 結合分析法

分析法は Terranova ら記載 (Cell, 22: 719-728, 1980) のようなクレープ (Klebe) の方法を採用した。

【0022】4. 細胞の結合、

ラミニンの MCF-7 および T 47-D 乳ガン腫細胞お

および成人ヒト線維芽細胞CFL177およびCRL1507への結合は単細胞培養層を用いて行なった。すべての樹立細胞は完全培地を用いて多数の孔のある培養ざら(FB-6-Tc, Limbro)にレプリカした。細胞が50から70%に増えたとき、細胞を2時間洗うために培地を牛血清アルブミン0.1%含んだダルベッコ型イーグル培地と交換した。結合時に用いる培地はダルベッコ型イーグル培地、0.1%牛血清アルブミンおよび20 mMヘッペスバッファー(pH 7.4)から成っていた。

^{125}I で標識したラミニン(^{125}I -ラミニン)を過剰の未標識ラミニンまたは過剰の未標識ラミニンフラグメントといっしょにして、リン酸加塩緩衝液(P_1/NaCl)250 μl に加え結合分析を開始した。20°Cおよび37°Cで各時間培養したあと、結合に用いた培地をすばやく吸引し、氷で冷やした P_1/NaCl (0.2%牛血清アルブミンを含む)で3回洗い未結合物を除いた。そのあと細胞は P_1/NaCl 中にEDTA 0.02%添加した溶液を使って剥がし、細胞に結合した放射活性をサール(Skokie, IL)のオートガンマカウンターによって測定した。比結合は結合した放射活性の合計から100倍量の未標識物質の加剤存在下で結合した量を差引いた値と定義した。

【0023】5. コラーゲン結合

IV型コラーゲンを0.5M酢酸に溶解し、つづいて0.05MトリスHC1/0.9MNaCl(pH 7.4)溶液で中和した。溶液(25 μg)のうち5 μl の細孔径をもった13mm SCWPニトロセルロース滤紙(ミリポア)の上にのせた。それからその滤紙を牛血清アルブミン3%を含む P_1/NaCl 中に4°Cで一晩浸した。洗浄後、 ^{125}I 標識ラミニン(1mg/ml)または精製した ^{125}I 標識ラミニンフラグメントをその滤紙に塗布(10 μl)し、相対湿度100%の容器内で20分間インキュベートした。 P_1/NaCl でよく洗った後、結合した放射活性をガンマカウンターにより定量した。

【0024】6. ロータリーシャドーイング(Rotary shadowing)および電子顕微鏡による観察

これらの手法は上記Raoが記載したイーグルらの変法に従って行なった。

B. 結果

1. 細胞のコラーゲンへの付着

トリプシン処理後間もないMCF-7、ZR-75-1およびT47-D細胞を様々な基質に加えた場合、MCF-7細胞はI型コラーゲンやプラスチックよりもIV型コラーゲンに選択的に付着した(I型、IV型コラーゲンに対するデータを表2に示す)。すべての実験においてMCF-7細胞はZR-75-1およびT47-D細胞に比べて、より急速に、より広範囲にIV型コラーゲンに結合した。細胞が特異的接着因子の存在により仲介作用をうけて特異的物質に付着するかどうかを決めるためI

10

20

30

40

50

型およびIV型コラーゲンへの細胞の付着について、外来性ラミニンおよびフィプロネクチンの効果をそれぞれ試験した。これらの因子が細胞内合成されてから接着に及ぼす影響を排除するために、細胞を培養液の中にシクロヘキサミンで処理してタンパク合成を阻害した。シクロヘキサミドの存在下、ラミニンは3つの樹立細胞系のすべてを刺激してIV型コラーゲンへのそれらの付着を惹起した。ラミニンはMCF-7細胞に対し8倍の刺激効果をもたらしたが、これと比較してZR-75-1細胞に対しては4倍、T47-D細胞に対しては2倍の刺激効果をもたらした(図3)。シクロヘキサミド存在下I型コラーゲンにフィプロネクチンを加えるとT47-D細胞の付着は7倍に増大し、ZR-75-1細胞の付着は5倍、MCF-7細胞の付着は2倍に増大した(図3)。これらのデータが示すところによれば、MCF細胞は基質としてIV型コラーゲンを特異的に選択し、ラミニンを接着因子とするということがわかる。ラミニンを同一の投与範囲で添加しても、これらの細胞のI型コラーゲンへの付着は促進されない。対照的にT47-D細胞はフィプロネクチンを仲介としてI型コラーゲンへ選択的に結合する。ところがZR-75-1細胞がラミニンまたはフィプロネクチンを仲介因子として、それぞれIV型またはI型コラーゲン基質へ付着する現象はみられなかった。

【0025】2. ラミニンフラグメントの結合特性

ラミニン分子のどの領域が細胞のIV型コラーゲンへの接着に対して仲介役を担うかを検討するために、ラミニンをプロテアーゼ処理して得られたフラグメントに対してそれらの結合特性に関する試験を実施した。

【0026】 α トロンビン処理して得られるラミニンの α 3フラグメントは、完全なラミニン分子が示すと同程度に、MCF-7細胞のIV型コラーゲンへの付着を促進した(表1)。 α 3フラグメントはミクログラム単位では活性を示すが、分子数単位では完全なラミニン分子よりも低い活性を示す。ラミニンの β 成分は接着活性を示さない。そのデータから結論として言えることは、ラミニンの α 3成分は細胞およびコラーゲン双方に対して結合する生物的に活性な部位を有しているということである。MCF-7およびT47-D細胞のI型およびIV型コラーゲンへの結合能に関する、 α 3ラミニン成分およびペプシン処理によって得られるP1すなわち分子量280,000のラミニンフラグメントの効果は完全なラミニン分子の存在下で測定した。 α 3成分はIV型コラーゲンへの接着を促進したが、一方P1フラグメントは接着を著しく抑制した(表1)。またフラグメントはI型コラーゲンへの接着効果を示さなかった(データは示さない)。しかしながらT47-D細胞はラミニンまたはラミニンフラグメントを仲介としてIV型コラーゲンへ付着したが、付着の度合は高くなかった。P1フラグメントを使った投与量対反応性の実験を図4に示す。MCF

細胞およびT47-D細胞双方のIV型コラーゲンへの付着はP1フラグメント濃度1.0 μg/m1のによって完全に抑制される。さらにMCF-7細胞のIV型コラーゲンへの付着は、カテプシンGによって消化されて得られるラミニンフラグメント（分子量35,000、C1と呼ぶ）を1 μg/m1の濃度で添加した場合、完全に抑制された。

【0027】3. 細胞へのラミニンの結合

ラミニンが上皮細胞のIV型コラーゲンへの付着を仲介するならば、この細胞はラミニン認識に関与する特異的な表面受容体を持っている可能性がある。さらに、線維芽細胞のような細胞は接着因子としてラミニンよりもフィブロネクチンを利用するので、ラミニン結合部位を欠いているにちがいない。¹²⁵Iラミニンが細胞に結合する高い親和性と特異性を示すかどうか測定する実験を行なった。ラミニンのMCF-7、T47-DおよびCFL-1477と1507樹立線維芽細胞への結合は時間依存性を示した。結合は試験したすべての樹立細胞で90分後に平衡に達した（図4および5）。ヒト樹立線維芽細胞CRL1477および1507においては特異的ラミニン受容体の証拠は見られなかった（図5）。ところが上皮性T47細胞はMCF-7細胞と比較した場合、低いながらもラミニン結合性を示した。スキッチャーリの結合分析（MCF-7細胞を使用して）によると、ほぼ直線に近いカーブが得られた。推定k_d値は50から2.2 nMであった。計算上、細胞あたりの結合部位は10,000から100,000となる。ラミニンに対する受容体は0.1%トリトン×100を使って細胞膜より抽出することができ、ラミニンアフィニティークロマトグラフィーを使って単離するとその分子量は60,000から75,000であった。ラミニンフラグメント α 3およびP1は双方とも¹²⁵Iラミニンと拮抗し、完全ラミニン分子と同様なレベルで結合した（図4）。ラミニンは付着しているMCF-7細胞と懸濁しているMCF-7細胞との両方に結合した。後者の場合、結合はトリプシン処理して、0.5%牛血清アルブミンを含んだダルベッコ型イーグル培地で培養後2時間たって確認された。熱変性ラミニンおよびフィブロネクチンは、¹²⁵Iラミニンと拮抗させて結合させるとその有効性は完全ラミニン分子に対して50分の1から500分の1であった。¹²⁵Iラミニンと¹²⁵Iラミニンフラグメントは双方とも結合分析に用いた場合、生物的活性を保持していた。それ故に、MCF-7およびT47-D細胞に結合するラミニンの主要部位は α 3ラミニン成分およびC1またはP1ラミニンフラグメントの双方に残っている（図4、表1）。

【0028】4. コラーゲンへのラミニンの結合

前記の事項とは対照的に、同一のラミニンフラグメント（ α 3およびP1）はニトロセルロースに固定化されたIV型コラーゲンへのそれらの結合性において著しい違い

を示した。完全ラミニン分子および α 3フラグメントはIV型コラーゲンに同時によく結合した（表1）。P1あるいはC1フラグメントはIV型コラーゲンへの結合性を示さなかった。様々なラミニンフラグメントの構造上および結合性に関する特性は図1に要約する。

実施例 III. 腫瘍細胞が有するラミニン受容体の単離

A. 材料と方法

転移性のBL6黒色腫はIam Hart博士（メリーランド州フレデリック）により供与された。この腫瘍細胞の付着特性は今までに記載されてきた。BL6細胞は10%牛胎児血清を補ったPRM11640培地で培養した。原形質膜は対数増殖期の細胞から単離した（J. Biol., 255, 1722-1731, 1980）。原形質膜ホモジネートを0.1%トリトン×100で可溶化した（1.0-2.0 mgタンパク/m1）。45分間30,000gで遠心したあと、上清を集めトリトンを除くためにSM2バイオヘッド（Bio-Rad）でインキュベートした。ラミニンリガンドおよび原形質膜抽出物の単離は上記のラクトバーオキシダーゼ法を用いて実施した。ラミニン受容体は懸濁している生細胞上に認められた。トリプシン処理後完全培地中でBL6細胞を37°C、2時間一定の攪拌条件下で培養した。標識リガンドと250倍の過剰の未標識リガンドを添加し25°Cで2時間さらに培養をつづけた。細胞に結合したリガンドと遊離のリガンドを遠心して分離した。原形質膜への結合分析は、固相ニトロセルロースの円形ミリポア-SCWP（上記Terranovaらの方法）または臭化シアンで活性化したセファロース4Bに結合させたりガンドまたは受容体対を使って実施した。後者の場合方法は次の通り。ラミニンまたは原形質膜抽出タンパク25 μgを臭化シアンで活性化したセファロース4B（100 μl）に結合させ、それに25 mM Tris, 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂のpH 7.4溶液を等量および0.1%牛血清アルブミンを含むこの緩衝液100 μlを加えた。¹²⁵I標識原形質膜抽出物（10 g cpm/mg）または¹²⁵I標識ラミニン（10 g cpm/mg）を加え、緩衝液で希釈して合計容量100 μlとした。拮抗反応は様々な濃度の未標識ラミニン溶液または未標識原形質膜抽出物（2から20 μg）を用いて実施した。結合分析のための混合物を4°Cで一晩インキュベートした。ラミニンセファロース粒子を5,000 rpm 30分間の遠心で集め、取れたペレットを0.1%牛血清アルブミンを含む緩衝液2.0 mlで2回洗った。最初の遠心で得られた上清中のタンパクとそのペレットをレムリー法による7%スラブゲルを使った電気泳動にかけ、つづいてオートラジオグラフィーを行って同定した。ラミニンアフィニティクロマトグラフィーは精製ラミニンで架橋したセファロース4Bを用いて実施した。¹²⁵I標識原形質膜抽出物を4°Cのラミニンセファロースアフィニティカラム（1×15 cm）中で15時間インキュベートした。放射活性をも

った未結合抽出物を2.5 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0.9% NaClのpH 7.4溶液4.0 mlで洗い出し、1.0 M Tris生理食塩水で中和し、凍結乾燥した。タンパクはスラグゲル電気泳動およびオートラジオグラフィーで同定した。ラミニン受容体部位およびk_d値はスキャッチャーパーチャー分析により計算した。

B. 結果

BL 6 黒色腫のラミニンとの結合には飽和点があった。スキャッチャーパーチャー分析によれば、細胞あたり110,000の結合部位があり、k_d = 2.2 nmの高い親和性（図6A）を示した。ラミニンの腫瘍細胞への結合はトリプシン処理によって妨害された。血清を含まない培地あるいは血清を含んだ培地中で細胞を2時間培養すると、受容体が再生した。コラーゲン、変性ラミニン、フィブロネクチン、血清は結合に対して拮抗しなかった。¹²⁵Iラミニンの単離した細胞原形質膜への結合をみると、k_d = 1.5 nmと高い親和性（図6B）をもっていた。過剰の未標識ラミニンを加えると、固相に固定化したラミニンへの可溶化した膜受容体の結合に対して拮抗反応がみられた。拮抗反応前と後において、ラミニンに結合した膜タンパクの可溶化物をゲル電気泳動にかけると、受容体は単一の分子量をもっていることがわかった（図7）。それ故、その受容体を単離するためにラミニンクロマトグラフィーを実施した（図8、9）。その結果、膜の粗抽出物に対して900倍で精製された。受容体の分子量は還元したのちポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると67,000とわかった。単離した受容体はラミニンに対して大きな結合親和性（k_d = 2 nm）を保持していた（図6C）。

【0029】実施例IV. ヒト乳ガン腫細胞におけるラミニン受容体の測定。

A. 材料と方法

ヒト乳ガン組織の標本は、生検により侵入性乳管ガン腫とわかった乳房の切除術時に得られた。組織を液体窒素で凍結し、粉碎した。粉碎した組織を2.5 mM Tris, 0.3 M ショ糖のpH 7.4溶液を用い1:4の容量比で希釈し、ポリトロン（polytron）を使って0°Cでホモジネートした。そのホモジネート溶液を20分間15,000 gで遠心し、脂肪層を捨て上清を取ってさらに4°C 60分間100,000 gで遠心した。ペレットを1.5 mM MgSO₄、および0.15 mM CaCl₂を含む2.5 mM Tris緩衝液（pH 7.4）中に懸濁し、この膜調製液を100 mg/100 mlになるよう希釈した。

【0030】2. 結合分析

ラミニンあるいはラミニンフラグメントを前記のごとく精製し、ヨウ素化した。結合分析は室温で90分間、膜分画100 mlと2.3 × 10⁻⁹ M当り70,000 cpmの比活性をもつ¹²⁵Iラミニンを用いて行なった。

特異的結合は、10,000倍濃度の未標識拮抗剤リガンドを使用して測定した。結合したリガンドおよび遊離のリガンドを5,000 gで30分間遠心して分離した。

B. 結果

ヒト乳ガン組織から得た原形質分画は経時的検討を行なうと、ラミニンとの結合において飽和点を示した（図10）。1時間後結合はブロートに達した（25°C）。ブロート期に達した後1000倍の未標識リガンドを加えて、すばやく標識リガンドと交換した。特異的結合はスキャッチャーパーチャー分析によると直線性が得られ、結合部位は単一であることがわかった（γ = 0.85）（図11）。新生細胞を含まない哺乳類の線維硬化組織から得られた試料では特異的結合は認められなかった。膜分画を熱変性すると結合活性がなくなった。フィブロネクチン、上皮性増殖因子または血清は拮抗反応に関与しなかった。ラミニン分子の精製フラグメントを使用すると（図12）様々な結合機能を有するラミニンの領域を同定することができた。完全ラミニン分子はクロス-バイ-ロータリーシャドーイング電顕法によれば4本の腕があるよう見える。長腕を欠くフラグメントはラミニン受容体に対する結合活性を完全にもつていて、細胞への接着を仲介し、IV型コラーゲンへ結合する。一方長腕と短腕の末端球状部位を欠くフラグメントは完全ラミニン分子に匹敵する親和性をもち、拮抗しながら受容体へ特異的に結合した。

実施例V. ラミニン受容体に対する抗体の調製。

【0031】実施例IIに従って精製した受容体に対する抗体は、ニュージーランド白ウサギに、フロイント完全アジュバントに乳濁した単離受容体を3回注射（1回当たり250 μg）して調製した。抗体の特異性は標準固相免疫検定法により確認した。抗体を放射標識し、ラミニン受容体に対する従来からの放射免疫検定法に用いる。

実施例VI. 生体内におけるC1ラミニンフラグメントによる治療

BL 6 黒色腫細胞（実施例III）をラミニンのC1フラグメント（実施例Iのようにして得た）と共に、C1濃度は細胞1 ml当り1 mgおよび10 mgとして、前培養した。培養した細胞を集め、マウスの標準観察記録に従ってヌードマウスの生体内へ注入した。対照マウス3匹、処理マウス6匹を3週間後解剖して、その肺を調べた。対照マウスの肺には数多くの転移が見られたが、1 mg/m lのC1を処理した3匹のマウスの肺では転移の数が減っており、10 mg/m lのC1を処理した3匹のマウスの肺では実質上転移は見られなかった。実験を7回繰り返し、比較しうる結果を得た。ひとつの実験から得られた肺を表わす代表的な写真を図13に示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】ラミニン分子に存在する結合部位を示す説明図。

【図2】P1およびC1ラミニンフラグメントにより抑制されるMCF-7およびT47-D細胞のIV型コラーゲン基質への付着パーセントを示す特性図。

【図3】ラミニンが仲介したMCF-7、ZR-75-1およびT47-D乳ガン細胞のIV型コラーゲンへの付着、および、フィブロネクチンが仲介したMCF-7、ZR-75-1およびT47-D乳ガン細胞のI型コラーゲンへの付着に関する投与量-反応曲線を示す特性図。

【図4】MCF-7およびT47-D細胞双方のIV型コラーゲンへの付着のP1フラグメントによる阻害およびMCF-7細胞のIV型コラーゲンへの付着の分子量35,000のラミニンフラグメントによる阻害を示した投与量対反応性の実験の結果を示す特性図。

【図5】ヒト樹立線維芽細胞CRL1477および1507が特異的ラミニン受容体の証拠を示さないのでに対して、上皮性T47-D細胞はMCF-7細胞と比較した場合に低いラミニン結合性を示したことを表す、¹²⁵Iラミニンの各種の細胞への結合と時間との関係を示す特性図。

【図6】(A)はBL6黒色腫のラミニンへの結合の親*

*和性を示す特性図、(B)は¹²⁵Iラミニンの単離した細胞原形質膜への結合の親和性を示す特性図、(C)は単離した原形質膜受容体のラミニンへの結合の親和性を示す特性図。

【図7】ラミニンに結合した膜タンパクの可溶化物のゲル電気泳動像を示す図。

【図8】単離した可溶性細胞原形質膜受容体についてのラミニンアフィニティクロマトグラフの結果を示す写真。

【図9】単離した可溶性細胞原形質膜受容体についてのラミニンアフィニティクロマトグラフを示す特性図。

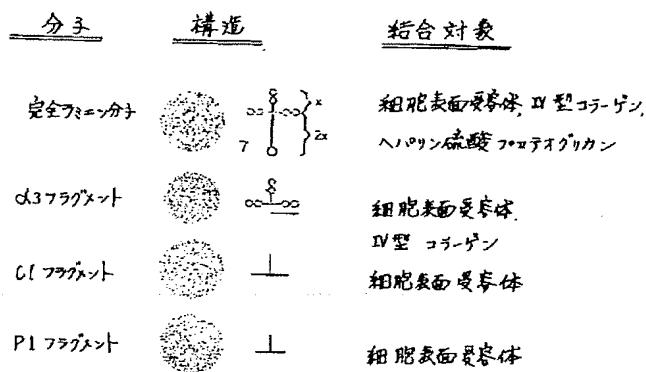
【図10】ヒト乳ガン組織から得た原形質膜分画のラミニンとの結合の飽和を示す特性図。

【図11】ヒト乳ガン組織のラミニンに対するスキャッチャーパーティー分析を示す特性図。

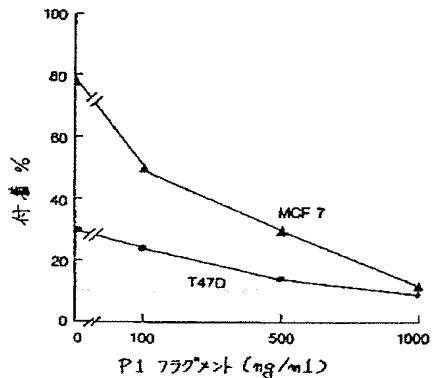
【図12】4本の腕を有するクロス-バイ-ロータリーラミニンフラグメントを示す電子顕微鏡写真。

【図13】夫々1mgおよび10mgのC1フラグメントで前培養したBL6黒色腫細胞を投与したマウスの肺およびコントロールとしてBL6黒色腫細胞を投与したマウスの肺を示す生物の形態を示す写真。

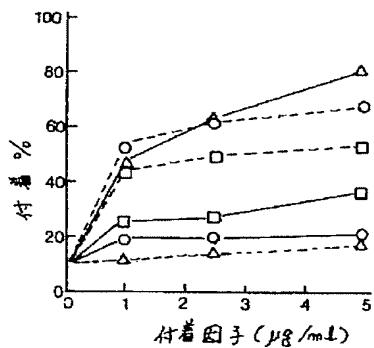
【図1】



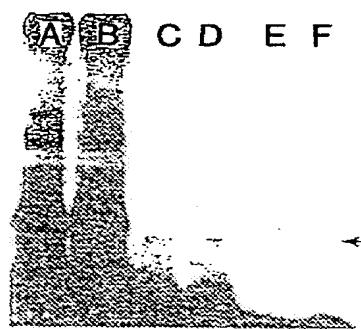
【図2】



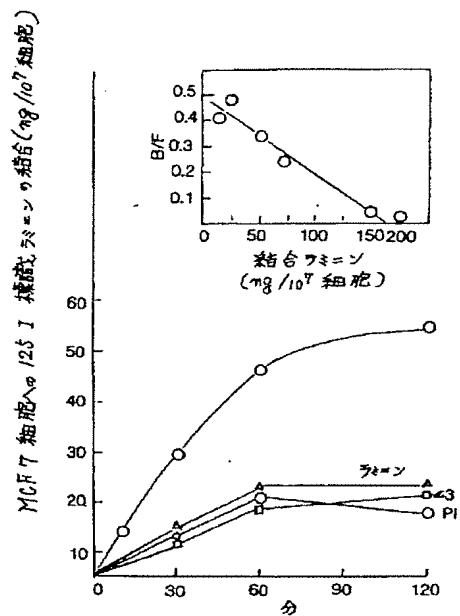
【図3】



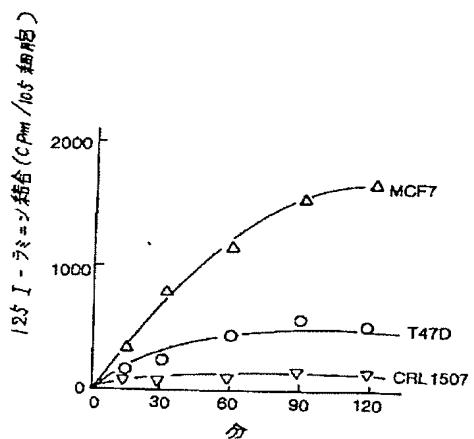
【図7】



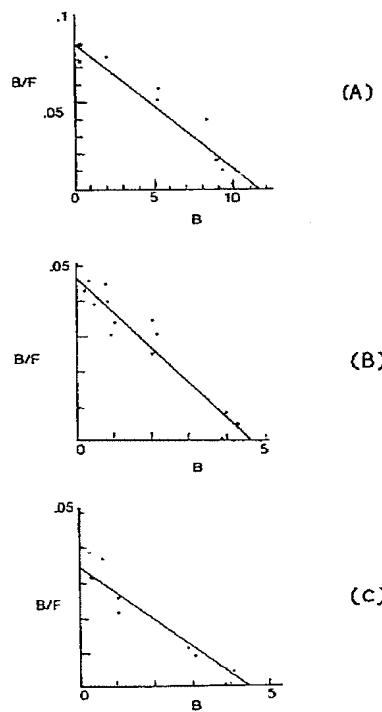
【図4】



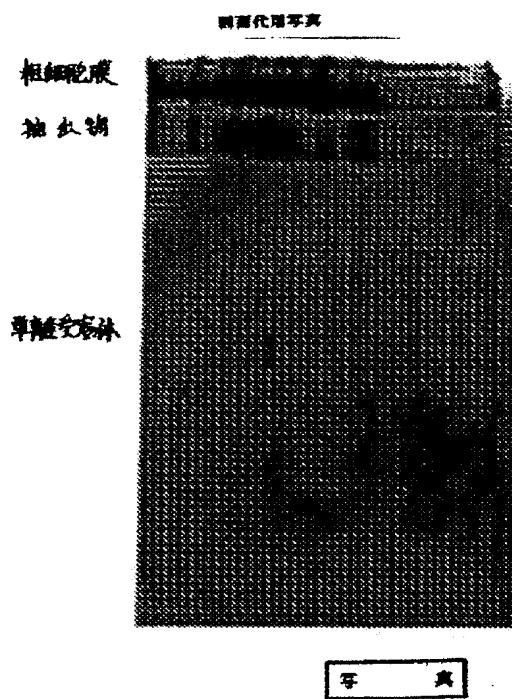
【図5】



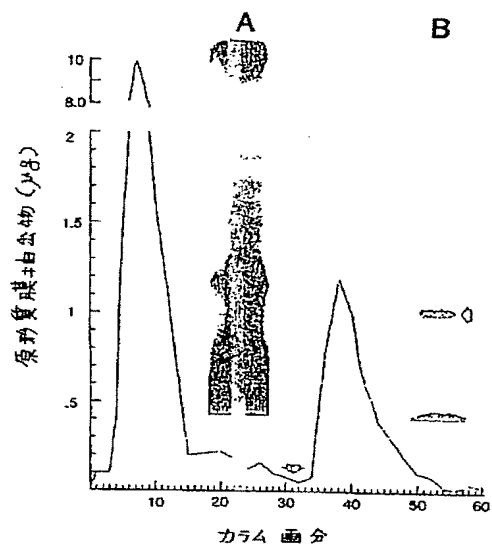
【図6】



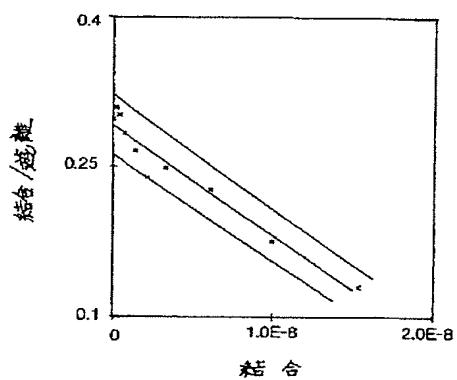
【図8】



【図9】

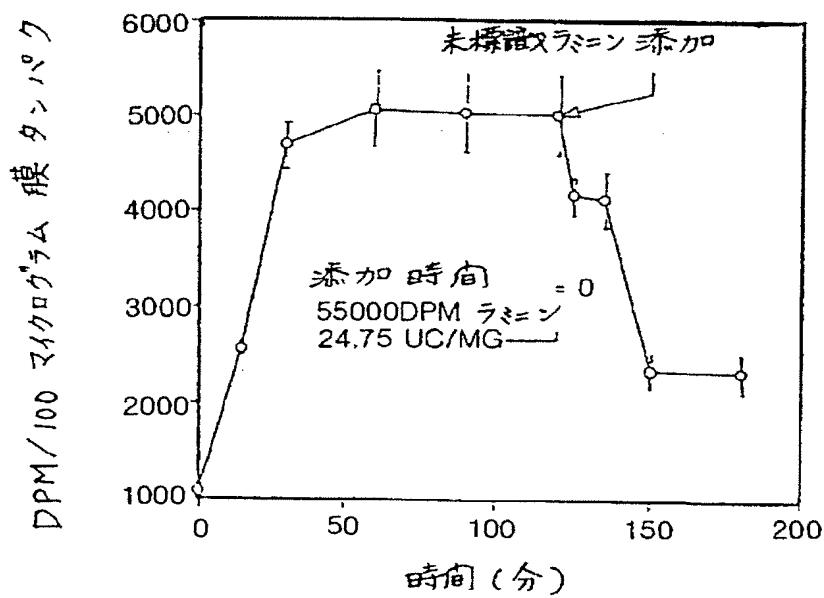


【図11】

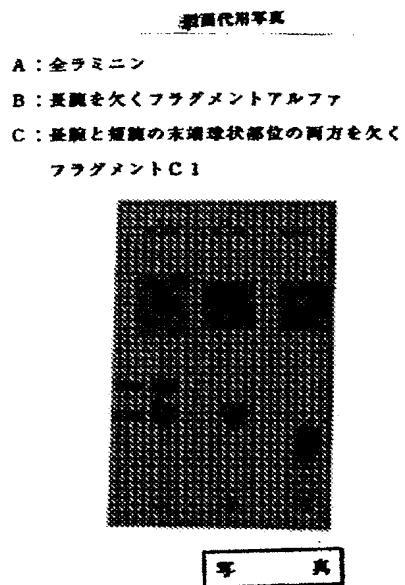


【図10】

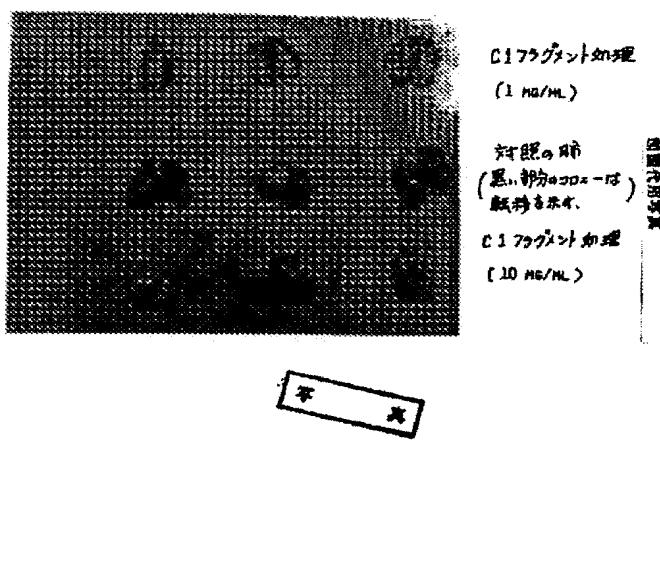
経時変化：拮抗置換を伴った
ラミニンの結合



【図12】



【図13】



フロントページの続き

(72)発明者 ナグスワラ・シー・ラオ
アメリカ合衆国 メリーランド州 20852
ロックビル、ロックビル・バイケ
1001、アパートメント 1809

(72)発明者 ピクター・ビー・テラノバ
アメリカ合衆国、メリーランド州 20879
ゲイザースバーグ、デュッハー・ウェイ
9636